

ATIVIDADE DO EXTRATO DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* FRENTE A PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO U87MG

GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA¹; FRANCELÍ DA SILVA DOS SANTOS²;
JULIANE TORCHELSSEN SARAIVA³; JÚLIA ARAÚJO DA SILVA⁴, NATHALIA
STARK PEDRA⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – giuliadasilvas2002@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – juliaaraujodsilva@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é um glioma de grau 4, reconhecido pela sua alta incidência e malignidade. Apresenta vias de sinalização genéticas e moleculares que interferem na regulação, proliferação e sobrevivência das células cancerosas, contribuindo para a progressão tumoral e a complexidade fisiopatológica da doença (SANTOS et al. 2019; ZHAI et al., 2021).

A terapêutica atual é baseada na associação de cirurgia, radioterapia e administração do quimioterápico temozolomida. No entanto, mesmo após o tratamento, a sobrevida média dos pacientes acometidos pelo GBM é de 14 a 18 meses (SANTOS et al. 2019). Diante disso, a investigação de novas moléculas com efeito antiglioma é essencial para reduzir a malignidade do tumor e melhorar o prognóstico dos pacientes.

Nesse contexto, as plantas são alternativas promissoras, pois possuem arsenal bioquímico diverso, auxiliando no desenvolvimento de diversos fármacos utilizados atualmente (NEWMAN & CRAGG, 2020). O fruto amarelo de *Psidium cattleianum*, planta nativa do Brasil, é popularmente conhecido como araçá e apresenta em sua composição moléculas bioativas como taninos e flavonoides capazes de inibir a proliferação celular e induzir apoptose em células neoplásicas (MEDINA et al., 2011; ABOTALEB et al., 2020). Assim, a composição diversa de polifenóis aumenta a possibilidade de atuar em diferentes mecanismos moleculares tornam o extrato de *Psidium cattleianum* um alvo de estudo promissor na terapia antiglioma.

Considerando o exposto, o presente estudo objetivou investigar a atividade do extrato padronizado de *Psidium cattleianum* frente a proliferação e sobrevivência celular em linhagem de glioblastoma humano U87MG.

2. METODOLOGIA

Os frutos amarelos de *Psidium cattleianum* foram cedidos pela EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul. E o extrato hidroalcoólico foi preparado de acordo com RAMOS et al. (2020).

A linhagem de glioma humano, U87MG, foi obtida da *American Type Culture Collection*, e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em placas de 96 poços e 24 poços em densidade de 5×10^3 e 20×10^3 células por poço, respectivamente, e mantidas sob condições padrões de cultivo celular (37°C e atmosfera umidificada com 5% de

CO_2). O tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Psidium cattleianum* foi realizado nas concentrações de 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ no teste de proliferação celular e de 2000 $\mu\text{g/mL}$ no teste clonogênico, sendo essa concentração escolhida baseada na concentração inibitória média ($\text{IC}50$) do teste de proliferação celular.

O teste de proliferação celular foi realizado de acordo com SKEHAN et al. (1990). É um método colorimétrico utilizando o corante sulforodamina B, que, em condições ácidas, se liga em resíduos de aminoácidos ácidos dos constituintes proteicos das células. A quantidade do corante ligado nas células é utilizada como referência para medir a massa celular, que pode ser extrapolada para determinar os níveis de proliferação celular (SKEHAN et al., 1990). As absorbâncias foram determinadas em um leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a 530 nm. As células não tratadas foram utilizadas como controle, e os resultados foram expressos em porcentagem.

O ensaio clonogênico seguiu o protocolo descrito por FRANKEN et al. (2006). Esse ensaio baseia-se na capacidade que uma única célula tem de crescer em colônias, sendo considerado um teste de sobrevivência celular. Para tal, as células foram inicialmente plaqueadas em placas de 24 poços, e tratadas com extrato de *Psidium cattleianum* na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Após, essas células foram semeadas em placas de 6 poços em baixa densidade (3×10^2 células por poço) e incubadas em estufa sob condições padrões de cultivo celular por 10 dias na ausência de tratamento. Terminado esse período, as células foram fixadas com metanol absoluto gelado e coradas com cristal violeta (1%) para a visualização das colônias. O número e tamanho das colônias foram determinados através de microscópio invertido (40x) e software ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, USA).

Os dados foram analisados em triplicata, utilizando o software GraphPad Prism. As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey para o ensaio de proliferação celular e o teste *t* de Student para o ensaio clonogênico, e os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na **Figura 1**, o extrato de *Psidium cattleianum* foi capaz de diminuir significativamente a proliferação celular em linhagem de GBM U87MG no tempo de 48 h nas concentrações de 750 a 2000 $\mu\text{g/mL}$, atingindo redução de 38% e 48%, nas concentrações de 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na **Figura 2A** e **2B**, pode-se observar que o extrato, na concentração previamente estabelecida de 2000 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de reduzir significativamente tanto o número quanto o tamanho de colônias, quando comparado ao controle.

O extrato de *Psidium cattleianum* apresenta em sua composição, majoritariamente, o tanino ácido elágico, o ácido fenólico ácido gálico, além do flavonoide catequina (dados não publicados). De acordo com WANG et al. (2016), o ácido elágico diminuiu o número de células de GBM humano U251 na fase G0/G1 do ciclo celular, induzindo a parada do ciclo celular na fase S e inibindo a expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2. Ademais, o ácido gálico influencia a expressão de alguns miRNAs que controlam vias significativas envolvidas na atividade antioxidante, progressão do ciclo e morte celular em

células T98G de GBM (PAOLINI et al., 2015). Ainda, SHENG (2015) relatou que o tratamento com catequina em células de glioma U87MG resultou no bloqueio da via de sinalização MAPK/ERK, envolvida na sinalização intracelular que regula vários processos celulares, como crescimento e sobrevivência celular, os quais estão superexpressos no GBM.

A partir dos dados apresentados e dos relatos da literatura, é possível inferir que as moléculas bioativas presentes no extrato de *Psidium cattleianum* atuam em diferentes mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, o que é relevante para o tratamento de patologias multifatoriais, como o GBM.

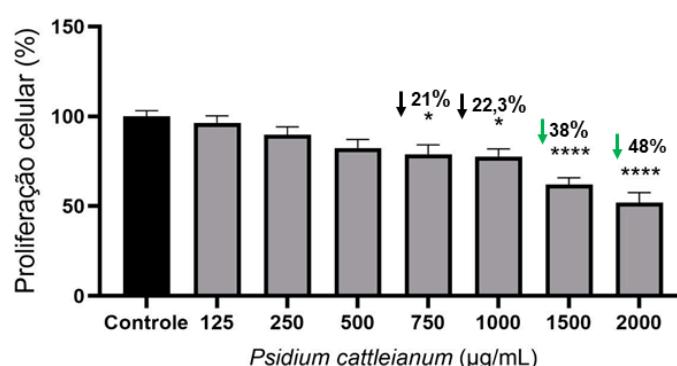


Figura 1. Efeito do tratamento com extrato de *Psidium cattleianum* (125-2000 $\mu\text{g/mL}$) sobre a proliferação celular de linhagem de glioblastoma U87MG, após tratamento durante 48 h. Dados expressos como média \pm erro padrão, analisados por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. * $P<0,05$ e **** $P<0,0001$ significativamente diferente do controle.

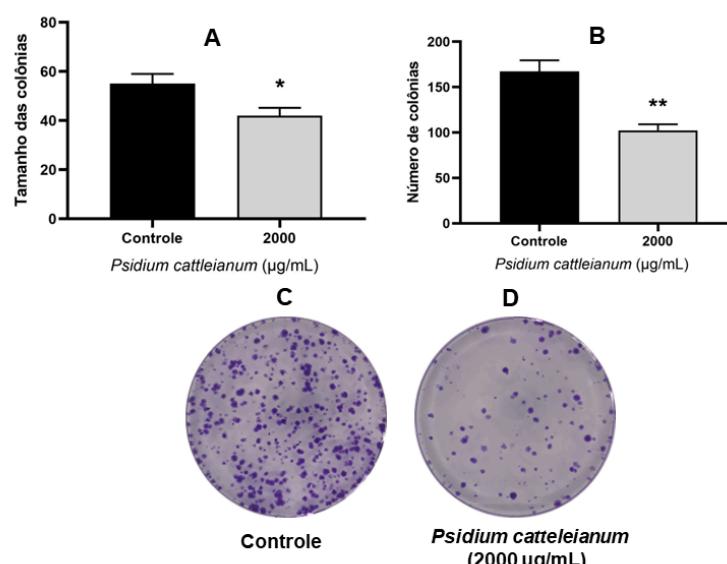


Figura 2. Efeito do tratamento com extrato de *Psidium cattleianum* (2000 $\mu\text{g/mL}$) sobre a formação de colônias. As células não tratadas (C), tratadas (D), representação gráfica do número (A), tamanho (B) das colônias após 48 h em linhagem de GBM U87MG. Dados estão expressos em média \pm erro padrão.

* $P<0,05$ e ** $P<0,01$ significativamente diferente do controle.

4. CONCLUSÕES

Os resultados relatados no presente estudo demonstram que o extrato dos frutos amarelos de *Psidium cattleianum* é capaz de reduzir a sobrevida e a proliferação celular na linhagem de glioblastoma humano U87MG. Contudo, mais estudos são necessários a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos apresentados pelo extrato de *Psidium cattleianum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOTALEB, M. et al. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.
- FRANKEN, N. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n.5, p. 2315-2319, 2006.
- MEDINA, A. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020
- PAOLINI, A. et al. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **International Journal of Oncology**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 1491-1497, 2015.
- RAMOS, V. et al. Hypolipidemic and anti-inflammatory properties of phenolic rich *Butia odorata* fruit extract: potential involvement of paraoxonase activity. **Biomarkers**, v. 25, p. 417-424, 2020.
- SANTOS, M. et al. **Diretrizes oncológicas 2**. São Paulo: Doctor Press Editora Científica, 2019.
- SHENG, Z. Z. Anticancer effects of catechin flavonoid in human glioma cells are mediated via autophagy induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and targeting MAPK/ERK signalling pathway. **Journal of B.U.ON.**, v. 2, p. 1084-1090, 2015.
- SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- WANG, D. et al. Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 143-149, 2016.
- ZHAI, K. et al. Natural Compounds in Glioblastoma Therapy: Preclinical Insights, Mechanistic Pathways, and Outlook. **Cancers**, v. 13, n. 10, p. 2317, 2021.